

**PCT**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
Oficina InternacionalSOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

|  |           |  |
|--|-----------|--|
| <b>(51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>6</sup> :</b><br><b>A61K 38/22</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Número de publicación internacional:</b> <b>WO 99/53944</b><br><b>(43) Fecha de publicación internacional:</b> 28 de Octubre de 1999 (28.10.99)  |
| <b>(21) Solicitud internacional:</b> PCT/ES99/00101<br><b>(22) Fecha de la presentación internacional:</b> 16 de Abril de 1999 (16.04.99)<br><b>(30) Datos relativos a la prioridad:</b><br>P 9800814 17 de Abril de 1998 (17.04.98) ES<br><b>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):</b><br>UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID RECTORADO [ES/ES]; Avenida de Séneca, 2, E-28040 Madrid (ES).<br><b>(72) Inventores; e</b><br><b>(75) Inventores/solicitantes (sólo US):</b> PEREZ GOMARIZ, Rosa [ES/ES]; Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular, E-28040 Madrid (ES). LECETA MARTINEZ, Javier [ES/ES]; Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular, E-28040 Madrid (ES). DELGADO MORA, Mario [ES/ES]; Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular, E-28040 Madrid (ES). MARTINEZ MORA, Carmen [ES/ES]; Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular, E-28040 Madrid (ES). |           | <b>(81) Estados designados:</b> AU, CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Publicada</b><br><i>Con informe de búsqueda internacional.</i> |
| <b>(54) Title:</b> METHOD FOR TREATING THE ENDOTOXIC SHOCK IN MAMMALS<br><b>(54) Título:</b> METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL "SHOCK" ENDOTOXICO EN MAMIFEROS<br><b>(57) Abstract</b><br>Disclosed is the use of vasoactive intestinal peptide (VIP) and the peptide activator of the hypophyseal adenylcyclase (PACAP) in the treatment of the endotoxic shock in mammals. These substances inhibit the production of the tumoral necrosis factor (TNF) and of interleukine 6 (IL-6).<br><b>(57) Resumen</b><br>Se describe el uso del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) en el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos. Estas sustancias inhiben la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y de la interleukina 6 (IL-6).<br><br><b>BEST AVAILABLE COPY</b>  |           |  |

## TÍTULO

## METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL "SHOCK" ENDOTOXICO EN MAMIFEROS

## 5 ESTADO DE LA TECNICA

El shock endotóxico es todavía la mayor causa de mortalidad hospitalaria. Las estrategias para combatir los efectos del shock endotóxico se centran en contrarrestar los agentes bacterianos responsables del cuadro, en restaurar los parámetros hemodinámicos, prevenir la activación celular y modificar la acción de los mecanismos de defensa (Boyd O; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:98)

Hoy en día se acepta que la respuesta inflamatoria frente a los productos bacterianos contribuye directamente al desarrollo del shock endotóxico (Parillo JE; New England Journal of Medicine 1993, 328: 1471). Los productos tóxicos bacterianos y los liberados durante el daño tisular activan los mecanismos de defensa, implicando a células como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales, y a mediadores como citoquinas, factor de activación de las plaquetas, metabolitos del ácido araquidónico y óxido nítrico, causando cambios hemodinámicos y orgánicos lesivos para el huesped (Moldawer LL; Critical Care Medicine 1994,22: 3). Muchas citoquinas han sido propuestas como marcadores de la gravedad en el desarrollo del choque séptico. Los niveles circulantes de TNF-, IL-1, IL-6 e IL-8 se han correlacionado con la probabilidad de superar un episodio séptico. TNF-, e IL-1 administradas a humanos o a animales experimentales reproducen muchas de las manifestaciones hemodinámicas del choque séptico (Tracey KJ y col.; 1986, Science 234:470) y se ha ensayado su inhibición mediante inyección de receptores antagonistas y anticuerpos monoclonales bloqueantes con resultados diversos (Fisher CJ y col.; 1994, Critical Care Medicine,22: 12). Entre los marcadores inmunológicos los niveles circulantes de IL-6 son los mejores

indicadores de la gravedad de la sepsis y de las posibilidades de superación del episodio (Liaw YS y col.; 1997, Journal of the Formosan Medical Association, 96:685).

A pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos y de los progresos técnicos y farmacológicos hay todavía pocos resultados en una mejora de los datos de mortalidad que se traducen en una cifra de unos 200.000 decesos al año en Estados Unidos y Europa (Vicent J-L y Chamblou R; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:146).

El Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) es un péptido básico de 28 aminoácidos cuya secuencia es (Mutt V y Said SI; European Biochemistry 1974, 42:581):

10 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub>

Se aisló en primer lugar a partir de intestino delgado porcino y posteriormente se identificó en el cerebro y en terminaciones nerviosas del sistema periférico, estableciéndose su naturaleza como neuropéptido con propiedades neuromoduladoras (Fahrenkrug J; Pharmacology and Toxicology 1993, 72:354). Su nombre se debe a sus propiedades vasodilatadoras periféricas. También se ha identificado VIP en células cebadas de rata y en granulomas (Cutz E. Y col.; Nature 1978,275:661). Estudios inmuoquímicos realizados en secciones histológicas de timo, bazo y ganglios linfáticos de rata han identificado VIP inmunoreactivo en linfocitos de estos órganos (Leceta y col. Advances in Neuroimmunology 1996,6:29).

El VIP ejerce sus efectos biológicos a través de receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de siete dominios hidrofóbicos acoplados a proteínas G, las cuales transducen la información hasta las moléculas efectoras finales (Laburthe M y Couvineau A; Annals of the New York Academy of Sciences 1988, 527:296). Los receptores para VIP han sido caracterizados en numerosos tejidos como hígado y tejido adiposo entre otros y que corresponden a dos tipos, los llamados VIP1-R (Ishihara T y col.; Neuron 1992, 8:811) y VIP2-R (Lutz E. y col. FEBS Letters 1993, 334:3). En el sistema inmune se han caracterizado receptores específicos para VIP en una variedad de

células inmunes que incluyen linfocitos periféricos humanos, monocitos humanos, linfocitos de rata y de ratón, macrófagos alveolares de rata y macrófagos peritoneales de rata y ratón (Delgado M y col.; Regulatory Peptides 1996, 62:161). El VIP modula una gran variedad de funciones inmunes como son la función fagocítica, en cada una de las etapas del proceso, la respuesta proliferativa, la producción de inmunoglobulinas, la actividad NK y la producción de citocinas (Ganea y col.; Advances in Neuroimmunology 1996, 6:61).

El péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP) es un miembro de la familia de péptidos de la secretina/VIP/glucagón del que se conocen dos formas moleculares PACAP-38 Y PACAP-27, cuyas secuencias son respectivamente (Ogi K y col.; Biochemical and Biophysical Research communication 1993, 196:1511):

PACAP-38

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH<sub>2</sub>

PACAP-27

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH<sub>2</sub>

Ambos péptidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico.

También hay células productoras de PACAP en pulmón, células B pancreáticas e intestino (Arimura A; Regulatory Peptides 1992, 37:287). En el sistema inmune se ha descrito una gran abundancia de células positivas para PACAP en órganos linfoides centrales y periféricos (Gaytan F y col.; Cell and Tissue Research 1994, 276:233). Para el PACAP se han descrito tres tipos de receptores (Shivers BD y col.; Endocrinology

1991,128:3055; Inagaki N y col.; Proceeding of the National Academy of Sciences USA 1994, 91:2679): el receptor de PACAP tipo I (PACAP-R-I) con igual afinidad para el PACAP-38 y el PACAP-27, pero que posee una afinidad de 300 a 1000 veces menor por el VIP; el receptor de PACAP tipo II (PACAP-R-II) que reconoce con la misma afinidad al VIP, PACAP-38 y PACAP-27 por lo que se le denomina receptor común de VIP-PACAP y corresponde al receptor de VIP VIP1-R, y el receptor de PACAP tipo III (PACAP-R-III) que corresponde al receptor de VIP VIP2-R. Hasta el momento, son escasos los estudios sobre las acciones biológicas del PACAP en el sistema inmune. Los efectos del PACAP son en muchos casos similares a los del VIP modulando la función fagocítica y las respuestas proliferativas.

#### DESCRIPCION DE LA INVENCION

El objeto de esta invención es desarrollar preparados de VIP, PACAP y análogos como agentes terapéuticos en el tratamiento del shock endotóxico.

El tratamiento consiste en la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El VIP y el PACAP tienen efectos antiinflamatorios e inhiben la producción de IL-1, IL-6 y TNF-, en modelos animales de inducción de shock endotóxico. Al jugar estas citoquinas un papel importante en el desarrollo de dicho síndrome, VIP y PACAP pueden utilizarse para regular su producción.

Se sabe que la mayoría de los efectos del shock endotóxico están mediados por la activación del sistema inmune y los mecanismos inflamatorios del huésped como respuesta a los productos bacterianos. Los macrófagos juegan un papel muy relevante en este proceso pues tras su activación producen factores como óxido nítrico,

prostaglandinas y citoquinas responsables de síntomas tales como fiebre, hipotensión, microcoagulación diseminada, fallo orgánico múltiple y eventualmente la muerte. En este sentido se han descrito elevados niveles circulantes de TNF, IL-1 e IL-6 asociados a endotoxemia. En modelos animales estos síntomas se reproducen tanto por la administración de endotoxinas bacterianas (LPS) como por la inyección de TNF e IL-1. Otros estudios han puesto de manifiesto el valor diagnóstico en cuanto a probabilidad de supervivencia que representan los niveles circulantes de IL-6.

El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por varios tipos celulares que incluyen monocitos y macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos, células cebadas, células tumorales y fibroblastos. Es un importante factor regulador de otras citocinas pro-inflamatorias, como son IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. El TNF $\alpha$  induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, activa a los leucocitos para que destruyan los microorganismos, actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de proteínas séricas que contribuyen a la respuesta de fase aguda y activa el sistema de coagulación. Su sobreproducción conduce a enfermedades inmunopatológicas, autoinmunidad e inflamación.

La IL-6 es una citoquina multifuncional producida tanto por linfocitos como por células no linfoides. Regula varios aspectos de la respuesta inmune, como la producción de proteínas que median la fase aguda y la hematopoyesis. Además actúa como mediador en la respuesta inflamatoria. Su producción está regulada por varios factores, que incluyen TNF $\alpha$ , IL-1 y endotoxina bacteriana (LPS).

Se han ensayado estrategias de neutralización de estas citoquinas en el tratamiento del shock endotóxico pero los resultados no muestran que se produzca una mayor supervivencia a largo plazo. Un tratamiento que inhiba la producción de TNF e IL-6 representaría una considerable mejora en la evolución del shock endotóxico y en las probabilidades de supervivencia. La administración de VIP y PACAP en modelos

animales consigue estos efectos y nuestro invento consiste en la utilización de un tratamiento con estos neuropéptidos para aumentar la supervivencia en cuadros de shock endotóxico.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa la producción de  $\text{TNF}\alpha$  por parte de macrófagos murinos en cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) estimuladas con 10ngr/ml de LPS en presencia o ausencia de  $10^{-8}\text{M}$  de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

10

La Figura 2 representa la producción de  $\text{TNF}\alpha$  por parte de macrófagos murinos en cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ngr/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos,  $10^{-8}\text{M}$  de VIP o PACAP.

15 La Figura 3 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) estimuladas con 10ngr/ml de LPS en presencia o ausencia de  $10^{-8}\text{M}$  de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 4 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en  
20 cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ngr/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos,  $10^{-8}\text{M}$  de VIP o PACAP.

La Figura 5 presenta el análisis por "Northern blot" para la presencia de mRNA de  $\text{TNF}\alpha$  e IL-6 en macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de VIP o  
25 PACAP (18S representa el correspondiente rRNA como control de la cantidad total de RNA cargada).

La Figura 6 representa la supervivencia de ratones inyectados con 400 $\mu\text{gr.}$  de LPS y simultáneamente o a los 30 minutos, 1 ó 4 horas con 5nmol. de VIP o PACAP.

A. Control; B: VIP a 0 h.; C: VIP a 0,5 h; D: VIP a 1 h.; E: VIP a 4 h.;

## MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

- 5 Los ejemplos que siguen son sólo para ilustrar los resultados conseguidos y no limitan la utilización del invento que se detallan en las reivindicaciones especificadas.

### EJEMPLO 1

10 VIP y PACAP inhiben la producción de  $\text{TNF}\alpha$  en macrófagos estimulados con LPS

En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de  $\text{TNF}\alpha$  en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 60% y se produce con dosis de estimulación entre 1-10  
15 ngr./ml de LPS. La  $\text{IC}_{50}$  es de unos 80 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 1). El efecto inhibitor es el mismo si ambos neuropéptidos se añaden hasta 1 hora después de estimular los macrófagos con LPS, aunque disminuye progresivamente hasta desaparecer si se añaden después de 4 horas (ver Figura 2).

20

### EJEMPLO 2

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de  $\text{TNF}\alpha$  después de la inyección de LPS

- 25 En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de  $\text{TNF}\alpha$  2 horas después de la inyección de 25  $\mu\text{gr.}$  de LPS se aproximaron a los 4 ngr./ml. La administración simultánea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60%.

## EJEMPLO 3

VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos estimulados con LPS

- 5 En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 90% y se produce con dosis de estimulación de 10 ngr./ml de LPS. La IC<sub>50</sub> es de 8.6 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 3). El efecto inhibidor también se observa si  
10 los neuropéptidos se añaden después de la estimulación con LPS, aunque el grado de inhibición es progresivamente menor (ver Figura 4).

## EJEMPLO 4

- 15 VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de IL-6 después de la inyección de LPS

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de IL-6 2 horas después de la inyección de 25 µgr. de LPS se aproximaron a 1.5 ngr./ml. La administración simultánea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60% y un 75%  
20 respectivamente.

## EJEMPLO 5

VIP y PACAP regulan la producción de TNFα e IL-6 a nivel transcripcional

25

Se sometieron macrófagos de ratón a las condiciones experimentales de los ejemplos 1 y 3 y se aisló su mRNA, que después se analizó mediante Northern blot para detectar mRNA de TNFα e IL-6. La Figura 5 muestra la ausencia de transcritos para TNFα o IL-6 cuando los macrófagos activados con LPS son expuestos además a VIP o PACAP.

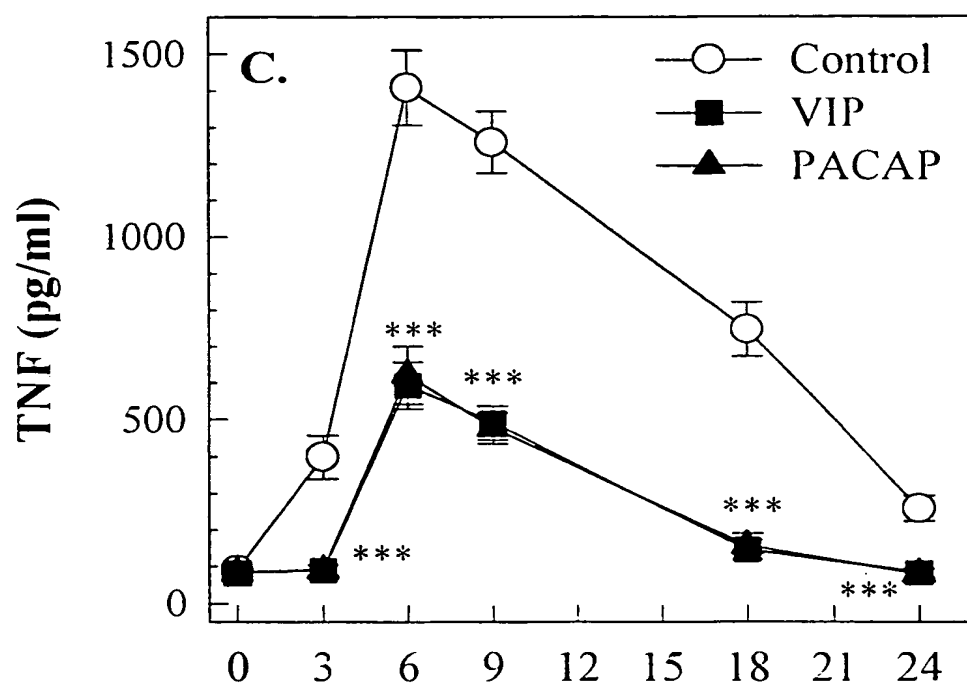
## EJEMPLO 6

VIP y PACAP protegen de los efectos letales de LPS

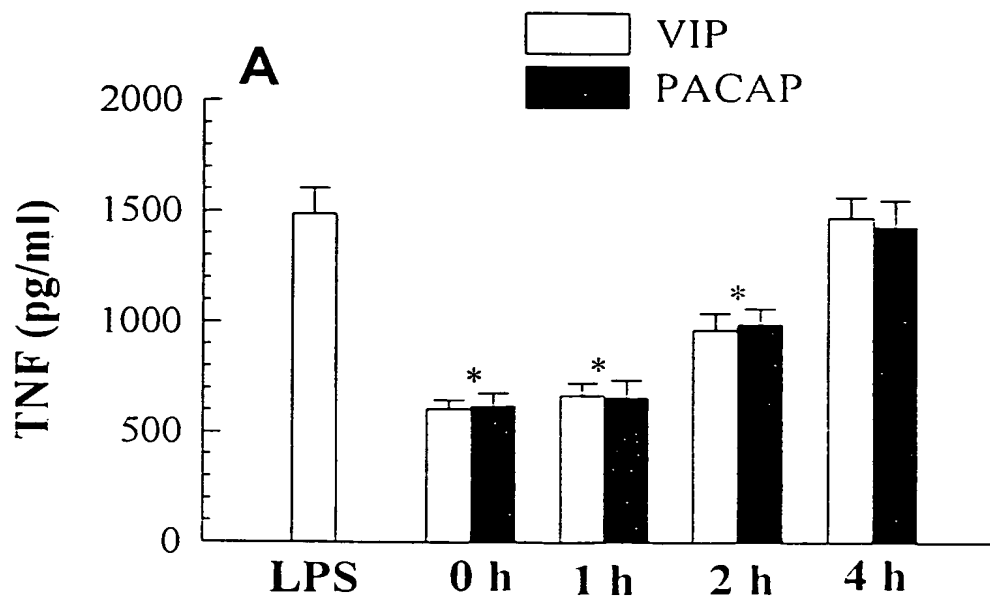
- 5 Se realizó un experimento en el que se estudió la supervivencia a lo largo de un periodo de 4 días en ratones después de inyectarles 400 $\mu$ gr. de LPS. Los resultados se reflejan en la Figura 6. La mortalidad en estas circunstancias fue del 100% a las 36 horas. Con la administración simultánea de 5 nmol. de VIP o PACAP se consiguió una supervivencia del 60% al final del experimento. La administración de los neuropéptidos hasta 1 hora
- 10 después de la inyección de LPS todavía registró tasas de supervivencia cercanas al 50%.

## REIVINDICACIONES

- 1.-Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos caracterizado porque  
5 comprende la administración de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la  
producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en un vehículo farmacéuticamente  
aceptable.
- 2.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos según la  
10 reivindicación 1, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido intestinal  
vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
- 3.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, según la  
reivindicación 1, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido activador de la  
15 adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo  
derivado.
- 4.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos caracterizado porque  
comprende la administración de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la  
20 producción de la interleuquina 6 (IL-6) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos según la  
reivindicación 4, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido intestinal  
vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
- 25 6.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, según la  
reivindicación 4, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido activador de la  
adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo  
derivado.

**FIGURA 1**

2/6

**FIGURA 2**

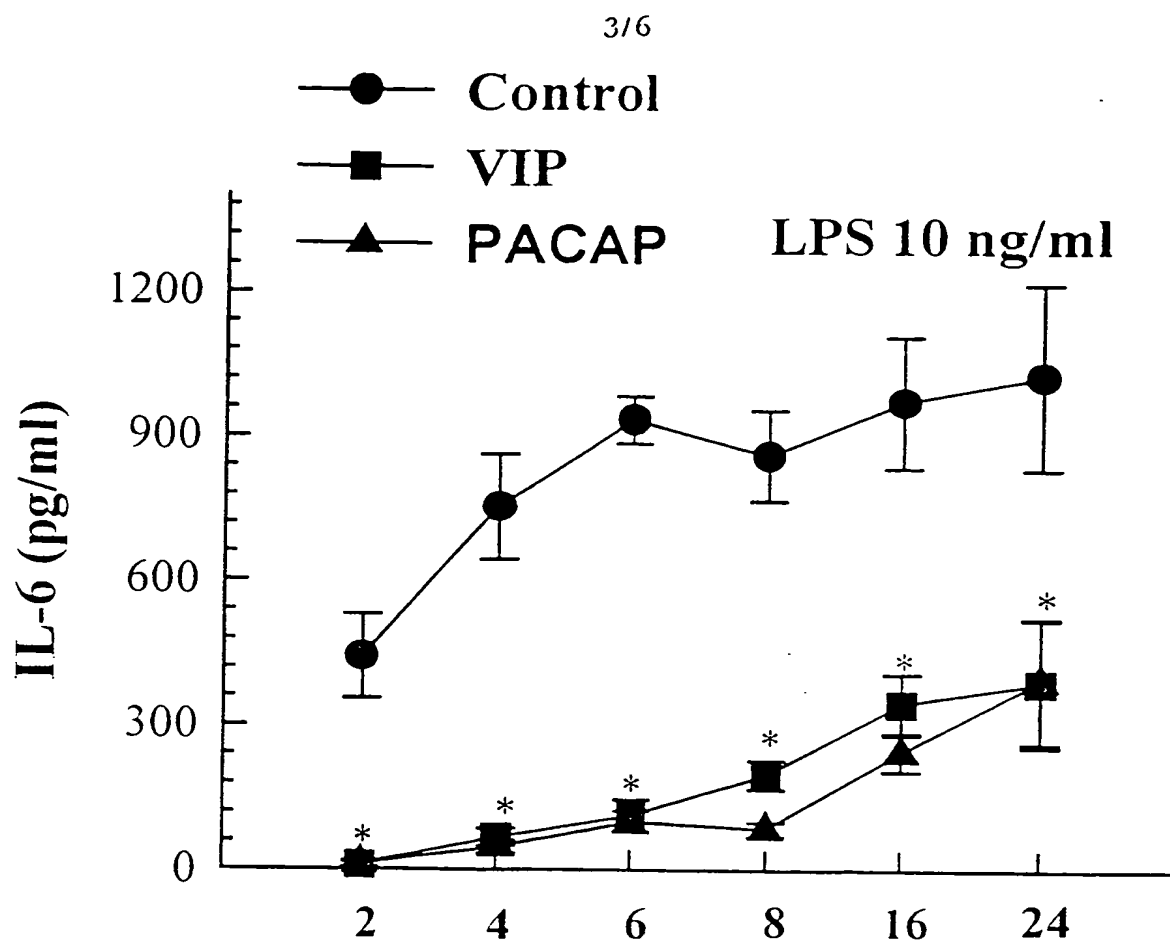


FIGURA 3

4/6

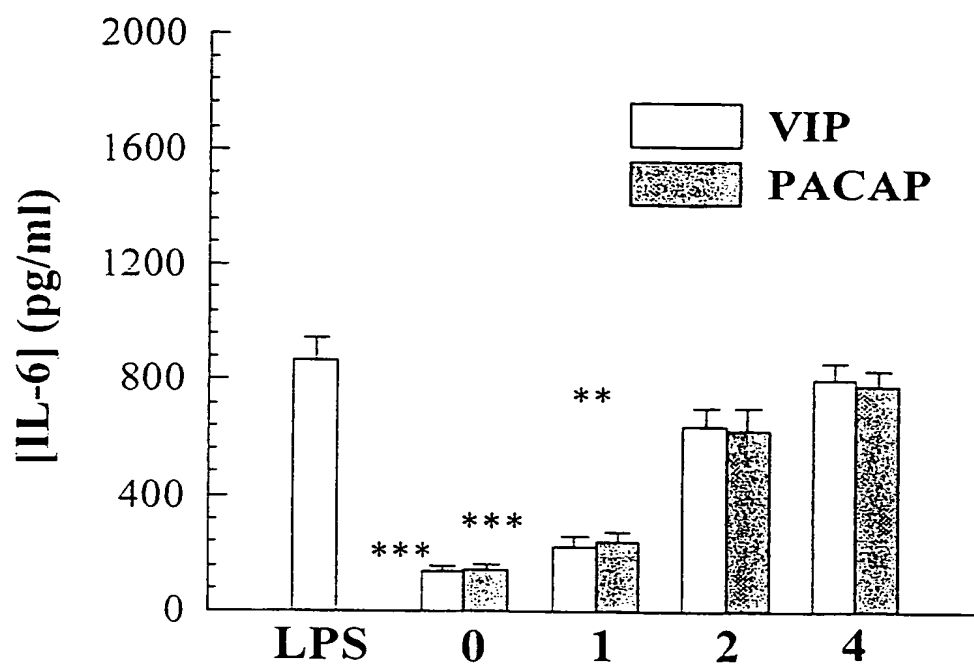


FIGURA 4

5/6

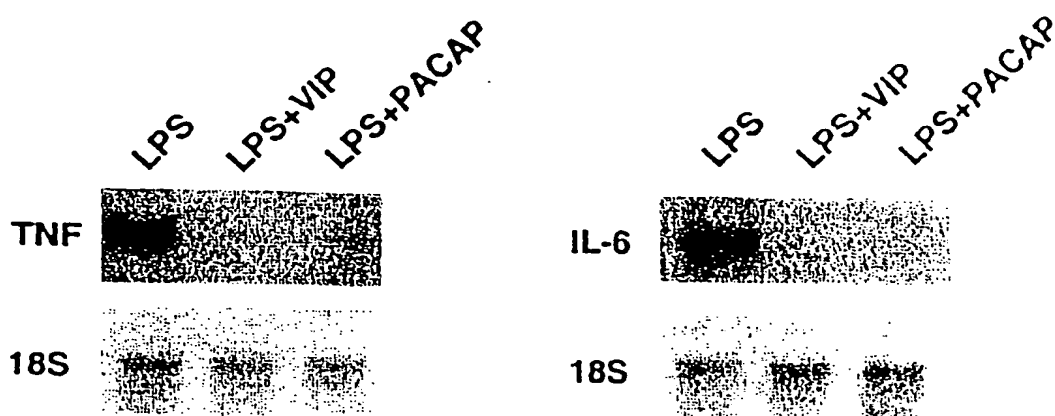


FIGURA 5

6/6

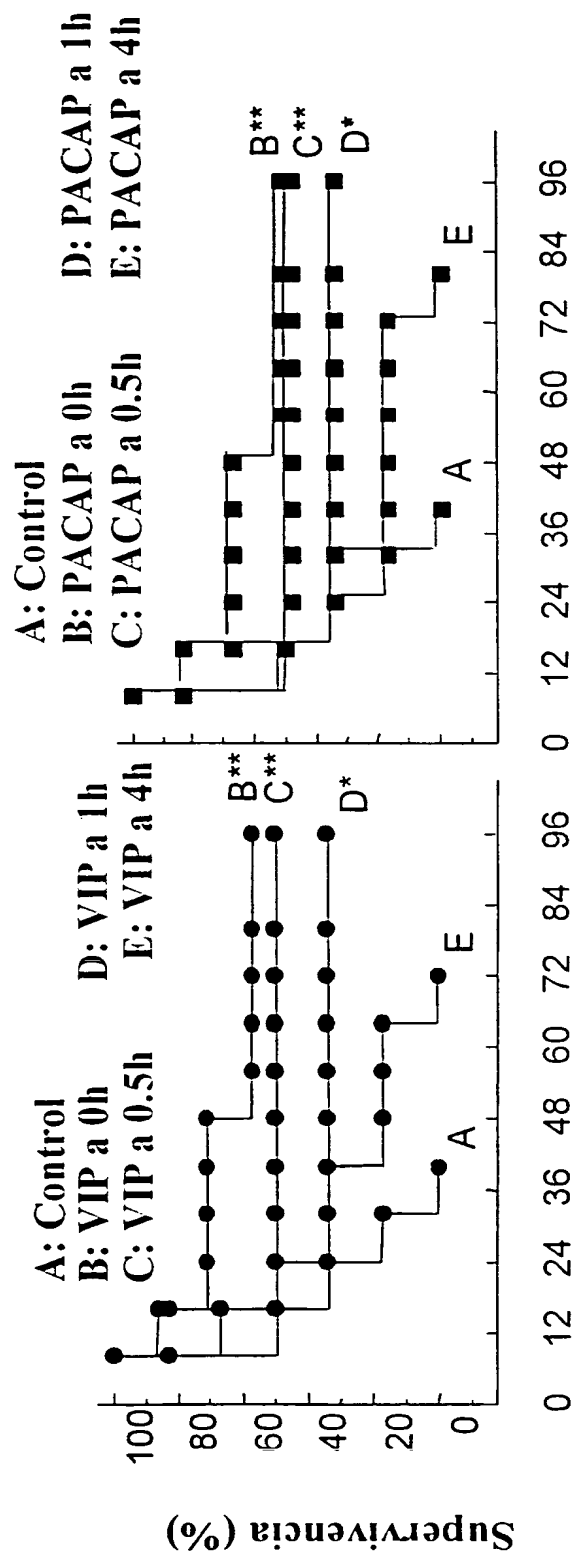


FIGURA 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 99/000000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:  
CIP 6 A61k 38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC6

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
CIP 6 A61K, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
EPODOC, CA, BIOSIS, MEDLINE, MEDLINE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | WO 9620926 A1 (CEL.GENE CORPORATION);<br>11 July 1996 (11.07.96), abstract.   | 1                     |
| X         | VERHOEF, J. et al. "The role of cytokines in Gram-positive bacterial shock".<br>TRENDS IN MICROBIOLOGY, Vol.3, n°4, April 1995,<br>pages 136-140, The whole document.   | 1,4                   |
| X         | BRONER, C. W. et al. "Cyclic nucleotides and vasoactive intestinal peptide<br>production in a rabbit model of Escherichia coli septicemia".<br>THE AMERICAN JOURNAL OF THE MEDICAL SCIENCES.<br>Vol: 309, n° 5, May 1995, pages 267-277, The whole document | 2,5                   |
| X         | YOSHINOBU, S. et al. "Anti-shock effect of pituitary adenylate cyclase<br>activating polypeptide (PACAP) on experimental endotoxin shock in dogs".<br>LIFE SCIENCES, Vol. 54, n° 22, 1994, pages 389-394, The whole document.                               | 3,6                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 July 1999 (19.07.99)

Date of mailing of the international search report  
29 July 1999 (29.07.99)

Name and mailing address of the ISA/

S. P. T. O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 99/00101

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-6  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 99/00101

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9620926 A1                             | 11.07.1996          | JP 10511946 T              | 17.11.1998          |
|   |                     | SK 86897 A                 | 14.01.1998          |
|   |                     | HU 77124 A                 | 02.03.1998          |
|   |                     | CZ 9702036 A               | 12.11.1997          |
|   |                     | PL 321065 A                | 24.11.1997          |
|   |                     | CA 2208671 A               | 11.07.1996          |
|   |                     | FI 972709 A                | 29.08.1997          |
|   |                     | EP 0800514 A               | 15.10.1997          |
|   |                     | AU 4246396 A               | 24.07.1996          |
| -----                                     | -----               | -----                      | -----               |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**